

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.

Vol. 27, 1989, pp. 53—56

© 1989 Walter de Gruyter & Co.

Berlin · New York

## Methoden zum Nachweis einer Barbituratvergiftung im Kliniklaboratorium

Von H. Gruhl

*Institut für Laboratoriumsmedizin, Zentralklinikum Augsburg*

(Eingegangen am 3. Oktober/6. Dezember 1988)

*Herrn Professor Dr. med. H. Wagener zum 60. Geburtstag gewidmet*

**Zusammenfassung:** Für 23 Barbiturate und den Hauptmetaboliten des Phenobarbitals wurden die Nachweisgrenzen im Urin mit einem Farbtest, der Dünnschichtchromatografie und vier immunologischen Verfahren bestimmt. Im Hinblick auf ihre Verwendbarkeit im Kliniklabor wurden die Verfahren auf Präzision, Zeitaufwand und Kosten untersucht.

*Methods for detecting poisoning with barbiturates in a clinical laboratory*

**Summary:** The detection limits for 23 barbiturates and the main metabolite of phenobarbital were determined in urine, using six different tests: a colorimetric test, TLC and four immunological tests. The precision, duration and costs of the tests were examined, in order to determine their suitability for a clinical laboratory.

### Einführung

Obwohl in letzter Zeit die Barbiturate als Hypnotika zunehmend von den Benzodiazepinen verdrängt werden, stellt die Vergiftung mit Barbituraten immer noch einen hohen Anteil im Untersuchungsgut intoxikierter Patienten dar. Der Nachweis von Barbituraten ist daher nach wie vor ein wesentlicher Bestandteil der klinisch-toxikologischen Analytik. Der Suchtest auf Medikamente wird üblicherweise im Urin durchgeführt. Wurden früher ausschließlich Farbtests (1, 2) und Dünnschichtchromatographie (3–7) zum qualitativen Nachweis von Barbituraten herangezogen, werden heute vermehrt Tests auf immunologischer Basis eingesetzt (8–12). Ziel dieser Arbeit ist es, sechs Methoden, die im wesentlichen für die Diagnose einer Barbituratvergiftung in einem klinischen Laboratorium in Frage kommen, gegenüberzustellen und sie hinsichtlich ihrer Nachweisempfindlichkeit und ihrer Präzision, ihrer Praktikabilität und der Kosten mit-

einander zu vergleichen. Folgende Verfahren wurden in die Untersuchung aufgenommen:

der Farbtest mit Quecksilber (II) / Dithizon nach Pehr (2);

die Dünnschichtchromatographie mit anschließender Detektion mit Quecksilber (II) / Diphenylcarbazon (3–7);

vier immunologische Verfahren, und zwar der Emit-ST (Fa. Syva); der Drogen Assay am TD<sub>x</sub> (Fa. Abbott); der Abuscreen (Fa. LaRoche) und der Urine Drugs of Abuse Screen am aca (Fa. DuPont).

Es wurden alle Barbiturate in die Untersuchung aufgenommen, welche in der Bundesrepublik Deutschland im Handel sind oder es in den letzten Jahren waren, da erfahrungsgemäß Medikamente, nachdem sie vom Markt genommen wurden, noch über Jahre hinaus verwendet werden.

## Material und Methoden

### Farbtest nach Pehr (2)

Dieser Test beruht auf der violetten Farbreaktion von Barbituraten mit Quecksilber (II) / Dithizon. Filtrierter Urin (2 ml) wird 30 s mit 2 ml Ether ausgeschüttelt. Der Etherextrakt (1 ml) wird mit 3,75 ml Pyridin/Natriumcarbonatlösung und 3 ml Hg(II)/Dithizon-Reagenz versetzt, 10 s kräftig geschüttelt und gegen einen entsprechenden Ansatz von Leerwert (Ether) und von Barbitat-Standard (10 mg/l) verglichen. Bei Anwesenheit von Barbituraten zeigt sich eine deutliche Violettfärbung im Gegensatz zur rosa Farbe des Leerwertes.

Pyridin/Natriumcarbonatlösung: 25 ml Pyridin + 100 ml 5 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; Hg(II)/Dithizon Reagenz: 10 ml einer 2 g/l wässrigen  $\text{HgCl}_2$  Lösung mit 100 ml einer Lösung von 10 mg Dithizon in einem Liter  $\text{CHCl}_3$  30 s schütteln, die organische Phase zweimal filtrieren und in dunkler Flasche aufbewahren (ca. 2 Monate stabil).

### Dünnschichtchromatographie

Auf pH 2 eingestellter Urin (20 ml) werden auf einer Extrelut 20 Extraktionssäule (Fa. Merck) mit zweimal 10 ml Ether extrahiert (13). Die ersten 4 ml Eluat werden aufgefangen und das Lösungsmittel durch Überblasen von Stickstoff bei ca. 50 °C (z. B. Heizblock Fa. Eppendorf) verdampft. (Die Wiederfindung wurde mit einem auf 100  $\mu\text{mol/l}$  Pentobarbital angestockten Urin getestet, sie betrug 75%.) Der Extraktionsrückstand wird in 50  $\mu\text{l}$  Isopropanol aufgenommen und 5  $\mu\text{l}$  hiervon in einem 1 cm langen Strich auf die DC Platte Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Fa. Merck) aufgetragen. Die Barbiturate werden ca. 8 min im Laufmittel Chloroform/Ethanol/25%iger Ammoniak 80 + 15 + 5 (Volumina) entwickelt (Laufmittel in dunkler Flasche ca. 2 Monate haltbar). Nach dem Trocknen werden die Platten mit Diphenylcarbazon (0,01 g Diphenylcarbazon in 100 ml Aceton/ $\text{H}_2\text{O}$  1 + 1) und anschließend mit  $\text{HgSO}_4$  (0,25 g  $\text{HgSO}_4$  in 100 ml 14%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) besprüht. Barbiturate ergeben eine violette Bande.

### Immunologische Verfahren

Der Emit-ST (Fa. Merck) ist ein homogener Enzymimmunoassay (Markerenzym Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, Meßwellenlänge 340 nm) und wird an einem eigens hierfür konstruierten Photometer durchgeführt. Der Abused Drug Assay (Fa. Abbott) beruht auf Fluoreszenzpolarisationsänderung des Antigen-Antikörperkomplexes und wird am  $\text{TD}_x$  (Fa. Abbott) gemessen. Der Abuscreen (Fa. LaRoche) stellt einen heterogenen Enzymimmuno-Assay (Enzym Meerrettich-Peroxidase, Meßwellenlänge 492 nm) dar und kann an jedem Photometer mit Durchflußküvette durchgeführt werden. Der Urine Drugs of Abuse Screen (Fa. DuPont) ist ein dem Emit (Fa. Syva) analoger, homogener Enzymimmunoassay (Markerenzym Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, Meßwellenlänge 340 nm), die Messung erfolgt am aca (automatic clinical analyser, Fa. DuPont).

Alle Tests wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### Urinproben

Drogenfreier Humanurin wurde mit den entsprechenden Barbituraten auf 2, 4, 10, 20, 40, 80, 200, 400, 1000, 5000 und 10 000  $\mu\text{mol/l}$  angestockt. Um den stöchiometrischen Vergleich zu gewährleisten, wurden die Stoffmengenkonzentrationen gewählt, da die Molekulargewichte der eingesetzten Barbiturate doch recht unterschiedlich sind (Barbital  $M_r$  184, Amylbarbitursäure  $M_r$  317).

Folgende Urinmengen werden benötigt: Farbtest nach Pehr 2 ml; Dünnschichtchromatographie 20 ml; Emit-ST 50  $\mu\text{l}$ ;  $\text{TD}_x$  100  $\mu\text{l}$ ; Abuscreen 25  $\mu\text{l}$ ; aca 320  $\mu\text{l}$ .

## Ergebnisse und Diskussion

### Nachweisgrenzen

Die mit den einzelnen Tests zu erzielenden Nachweisgrenzen für die verschiedenen Barbiturate sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Da im Falle von Vergiftungen die Barbiturate in grossen Mengen eingenommen wurden (bis zu einigen Gramm), sind die Nachweisgrenzen aller hier berücksichtigter Tests im allgemeinen ausreichend, um eine Intoxikation nachzuweisen. Dies kann auch durch die jahrelange Erfahrung mit dem Farbtest nach Pehr und der Dünnschichtchromatographie in unserem Laboratorium bestätigt werden. Schwierigkeiten bereiten lediglich Hexobarbital, Methohexital, Methylphenobarbital und Proxibarbal. Bei Hexobarbital und Methohexital handelt es sich um kurz wirkende Barbiturate, welche ausschließlich als Narkotika Verwendung finden und nur in Ampullenform im Handel sind, so daß diese Barbiturate für Vergiftungen kaum in Frage kommen. Methylphenobarbital wird zu Phenobarbital metabolisiert und kann als solches im Urin nachgewiesen werden.

Von den immunologischen Verfahren kann keines als generell nachweisstärker gegenüber den anderen bezeichnet werden, wenngleich es für die einzelnen Barbiturate durchaus Unterschiede in der Empfindlichkeit gibt. Am stärksten ausgeprägt ist dies bei Proxibarbal, hier lassen sich am aca ca. 50fach niedrigere Konzentrationen nachweisen als am  $\text{TD}_x$ . Die Relationen der Nachweisempfindlichkeiten zwischen den einzelnen Tests mögen sich aber von Charge zu Charge ändern.

### Präzision, Zeitaufwand und Kosten

In Tabelle 2 sind die Variationskoeffizienten von Tag zu Tag, der Zeitbedarf und die Reagenzienkosten für eine Einzelanalyse aufgelistet. Bei der Berechnung des Zeitbedarfs wurde davon ausgegangen, daß alle Reagenzien, soweit möglich, gebrauchsfertig vorhanden sind und sich die Geräte im „stand by“-Modus befinden. Die rein manuelle Tätigkeit ist in Klammern angegeben.

Der Farbtest ist in jedem Laboratorium durchführbar, er benötigt nur wenig Zeitaufwand und die Kosten sind zu vernachlässigen. Der Farbtest zeigte in unserem Laboratorium gute Übereinstimmung mit der Dünnschichtchromatographie (DC). Aufwendiger ist die DC, sie erfordert Erfahrung und der Barbituratsnachweis mittels DC hat nur Sinn im Rahmen eines allgemeinen Drogenscreenings. Dadurch reduzieren sich auch der anteilige Zeitbedarf und die Kosten, da

Tab. 1. Nachweisgrenzen für Barbiturate im Urin mit dem Farbstest (F), der Dünnschichtchromatographie (D), dem EMIT-ST (E), dem TD<sub>x</sub> (T), dem Abuscreen (A) und am aca (a). Angegeben ist jeweils die Konzentration, bei der der betreffende Test positiv wurde. > bedeutet, daß der Test bis zur höchsten getesteten Konzentration negativ blieb.

	Konzentration (µmol/l)											
	2	4	10	20	40	80	200	400	1000	5000	10 000	>
Allobarbitol	E	Aa	T		FD							
Amobarbital	T	D	Ea	FA								
Amylbromallyl-barbitursäure	ETAa	D		F								
Aprobarbital	Aa	E	T		F	D						
Barbital					FAa	D	ET					
Brallobarbitol	E	Ta	A	F		D						
Butalbital	EAa	T		FD								
Crotylbarbital	A	a	ET	F		D						
Cyclobarbital	T		DAa	F	E							
Cyclopentobarbital	ETAa			FD								
Heptabarb	T		DEAa	F								
Hexobarbital								D		T		FEAa
Methohexital							D		Ea	TA	F	
Methylphenobarbital				D	a		ET				A	F
Pentobarbital	Ea	DTA		F								
Phenobarbital	T		a	FEA	D							
Propallylonal	ETA	a		F	D							
Proxibarbal				a		A		E	FDT			
Secbutabarbital	a	E	TA	F	D							
Secobarbital	EAa	T		F		D						
Thiobutabarbital			a	F	E	DT	A					
Thiopental			DA	F	E		TA					
Vinylbital		DTa	EA	F								
Hydroxypheno-barbital		T	DA	a	E		F					

Tab. 2. Präzision, Zeitaufwand und Kosten einer Einzelanalyse. Angegeben sind die Variationskoeffizienten (VK) von Tag zu Tag für die Differenz der Meßsignale einer Urinprobe mit 4 µmol/l Secobarbital gegenüber dem „cut off“-Kalibrator, der Zeitaufwand (in Klammern die darin enthaltene manuelle Tätigkeit) sowie die ungefähren Reagenzienkosten für eine Einzelanalyse.

	VK (%) n = 11	Zeitaufwand (min)	Reagenzienkosten (DM)
Farbstest		6 (6)	<1
DC		26 (18)	7
Emit-ST	19,4	4 (2)	20
TD <sub>x</sub>	15,2	19 (2)	29
Abuscreen	10,9	30 (10)	14
aca	5,1	8 (1)	17

der gleiche Extrakt für den Nachweis einer Reihe anderer Substanzen wie Salicylate, Paracetamol etc. verwendet wird.

Auch wenn mit den immunologischen Verfahren nur qualitative Aussagen erhalten werden, spielt für das Ergebnis „positiv/negativ“ die Präzision des Tests eine wichtige Rolle. Angegeben sind in Tabelle 2 die Variationskoeffizienten von Tag zu Tag für die Differenz der Meßsignale einer Urinprobe mit 4 µmol/l Secobarbital und der Meßsignale für den „cut off“-Kali-

brator bzw. der niedrigen Kontrolle (TD<sub>x</sub>). Der „cut off“-Kalibrator enthält beim Emit-ST und aca 0,3 mg/l (1,26 µmol/l), beim Abuscreen 0,2 mg/l (0,84 µmol/l) Secobarbital. Am TD<sub>x</sub> beträgt der Schwellenwert 0,5 mg/l, die niedrige Kontrolle enthält 0,6 mg/l (2,52 µmol/l) Secobarbital. Der Test am aca zeigt die beste Präzision.

Der arbeitsaufwendigste immunologische Test ist der Abuscreen, er benötigt ca. 30 min, bis das Ergebnis vorliegt und bedarf eindeutig der meisten manuellen Tätigkeit. Die drei übrigen Tests sind hinsichtlich der Handhabung vergleichbar, am einfachsten ist der Test am aca durchzuführen.

Die Ermittlung der Kosten kann nur ungefähr erfolgen, da die Firmen den Laboratorien unterschiedliche Rabatte gewähren. Auch geht die Anzahl der mitgeführten Kontrollen direkt in die Kosten ein. So wurde für den Test am TD<sub>x</sub> nur eine Kontrolle berechnet, obwohl der Hersteller zwei vorschreibt, was m. E. nicht unbedingt erforderlich ist. Der besseren Vergleichbarkeit wurde auch für den Test am aca eine Kontrolle mitberechnet. Jedoch zeigt gerade dieser Test eine gute Präzision, zudem ist die Kalibrierung drei Monate stabil, so daß in der Praxis darauf verzichtet werden kann, bei jedem Einzeltest eine Kon-

trolle mitlaufen zu lassen. Eingerechnet sind die Kosten für die Kalibrierung, welche beim Emit-ST entfällt, am aca alle drei Monate mit drei Kalibratoren und am TD<sub>x</sub> alle 14 Tage mit sechs Kalibratoren durchgeführt werden muß. Für die Berechnung wurden 10 Tests pro Woche zugrunde gelegt.

Die Entscheidung, welcher Test zum Nachweis einer Barbituratvergiftung im Laboratorium zum Einsatz kommt, hängt einerseits davon ab, ob außer auf Barbiturate auch auf andere Medikamente oder Medikamentengruppen geprüft werden soll, zum anderen davon, ob sich ein hierfür geeignetes Gerät bereits im Labor befindet. Z. Zt. stehen an immunologischen Verfahren Barbiturate (ETAa), Benzodiazepine (ETa), Opiate (ETAa), Amphetamin/Methaphetamin (ETa), Kokainmetabolit (ETAa), Cannabinoide (ETAa), Methaqualon (E), Methadon (E) und Phencyclidin (ET) zur Verfügung, Methodenabkürzungen in Klammern wie in Tabelle 1. Die Angaben zur Präzision, zum Zeitaufwand und zu den Kosten in Tabelle 2 sollen bei der Auswahl der für ein bestimmtes Laboratorium geeignetsten Methode eine Hilfestellung geben.

## Literatur

1. Frahm, M. (1966) Nachweis von Barbitursäure-Derivaten im Harn; Dtsch. Med. Wochenschr. 91, 81–82.
2. Pehr, F. (1979) Improved, Highly Specific Barbiturate Screening in Urine by Colorimetry; Clin. Chem. 25, 1339–1340.
3. Bösch, J. (1970) Schlafmittelnachweise mittels Dünnschichtchromatografie; Ärztl. Lab. 16, 237–244.
4. Breiter, J., Helger, R. & Lang, H. (1976) Evaluation of Column Extraction: A new Procedure for the Analysis of Drugs in Body Fluids; Forensic Sci. 7, 131–140.
5. Interschick, E., Wüst, H. & Wimmer, H. (1978) Dünnschichtchromatografische Arzneimittelnachweise im Harn – Ein systematischer Analysengang; GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 22, 555–572, 625–626.
6. Winkelmann, M., Schrader, W. & Thomas, L. (1978) Laborchemischer Nachweis von Arzneimittelnvergiftungen und gewerblich bedingten Intoxikationen; Medica Fortbildungskurs 22. und 23. Nov. 1978. Broschüre Fa. Merck.
7. Schütz, H. (1982) Ein kombiniertes DC- und UV-Screening-Verfahren für gebräuchliche Schlaf- und Beruhigungsmittel mit Ausnahme der Benzodiazepine; Ärztl. Lab. 28, 47–57.
8. Oellerich, M., Kulpmann, R. & Haeckel, R. (1977) Drug Screening by Enzyme Immunoassay (Emit) und Thin-Layer Chromatography (Drug Screen); J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 275–283.
9. Oellerich, M. & Haeckel, R. (1979) Einsatz von Enzymimmunoassays beim Drogen-Screening; Lab. Med. 65, 65–70.
10. Oellerich, M. (1982) Diagnostik des Drogenabusus mit klinisch-chemischen Methoden; Deutsches Ärzteblatt 79, 41–49.
11. Gibitz, H. J. (1984) Toxikologische Screeningmethoden bei akuten, exogenen Vergiftungen. Diagnose, Verlaufskontrolle und Therapie schwerer exogener Vergiftungen (Deutsch, E., Kleinberger, G., Ritz, R. & Schuster, H. P., Hrsg.). F. K. Schattauer Verlag Stuttgart–New York, pp. 157–166.
12. Parker, K., White, B., Beattie, D. & Altmiller, D. (1988) Comprehensive Drug Screening for a Pediatric Population; Clin. Chem. 34, 748–750.
13. Gruhl, H. (1987) Zum Screening der Benzo- und Thienodiazepine im Urin mit dem Emit ST und der DC im Rahmen eines Suchtestes auf Medikamentenmißbrauch; Zeitschr. Rechtsmed. 98, 221–228.

## Danksagung

Herrn G. Herrmann danke ich für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Dr. Hartmut Gruhl  
Institut für Laboratoriumsmedizin  
Zentralklinikum  
Stenglinstraße 2  
D-8900 Augsburg